



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : A61K 9/51	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/04766 (43) Date de publication internationale: 4 février 1999 (04.02.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/01611 (22) Date de dépôt international: 21 juillet 1998 (21.07.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/09672 24 juillet 1997 (24.07.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I [FR/FR]; 43, boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): QUINTANAR, David [MX/MX]; Rio Panuco 38, Colinas del Lago, C.Izc, E.M., Mexico (MX). FESSI, Hatem [FR/FR]; 40, rue d'Aubigny, F-69003 Lyon (FR). DOELKER, Eric [CH/CH]; 56, chemin des Conches, CH-1231 Conches (CH). ALLEMANN, Eric [CH/CH]; 113, route des Hospitaliers, CH-1257 Croix-de-Rozon (CH). (74) Mandataire: ROPITAL-BONVARLET, Claude; Cabinet Beau de Loménie, 51, avenue Jean-Jaurès, Boîte postale 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>
(54) Title: METHOD FOR PREPARING VESICULAR NANOCAPSULES		
(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION DE NANOCAPSULES DE TYPE VESICULAIRE		
(57) Abstract		
<p>The invention concerns the preparation of nanoparticles for encapsulating active principles, and more precisely a method for obtaining vesicular nanoparticles dispersible in aqueous phase in colloidal form, which are non-toxic, biologically compatible, stable in colloidal suspension, protecting well the active principle and simply and inexpensively obtainable. The method consists in using two non-oily phases S₁ (ethyl acetate) and S₂ (water), non-miscible with each other and a third oily phase S₃ (mygliol); in producing an oil-in-water emulsion whereof the dispersed phase comprises S₃, S₁, or a polymer PE dissolved in S₁ and designed to form the nanocapsule envelope and optionally a dissolved active principle PA (S₁ being brought by a solution saturated with S₂ in S₁) and whereof the continuous phase is S₂ = non-solvent of PE; and in extracting from the dispersed phase, ensuring that the conditions of the continuous phase are such that S₁ is miscible in S₂, thereby obtaining a stable colloidal solution of nanocapsules with diameter of the order of 300 nanometers.</p>		
(57) Abrégé		
<p>L'invention concerne la préparation de nanoparticules pour l'encapsulation de principes actifs. L'un des objectifs de l'invention est de fournir un procédé d'obtention de nanocapsules vésiculaires dispersibles en phase aqueuse sous forme colloïdale, non-toxiques bio-compatibles, stables en suspension colloïdale, protégeant bien le principe actif et obtenables de manière simple et économique. Le procédé consiste à faire intervenir deux phases non huileuses S₁ (acétate d'éthyle) et S₂ (eau), non miscibles l'une à l'autre et une troisième phase huileuse S₃ (mygliol); à réaliser une émulsion huile dans l'eau dont la phase dispersée comprend S₃, S₁, ou un polymère PE dissous dans S₁ et destiné à former l'enveloppe des nanocapsules et éventuellement un principe actif PA dissous (S₁ étant apporté par une solution saturée de S₂ dans S₁) et dont la phase continue est S₂ = non-solvant de PE; et à extraire S₁ de la phase dispersée, en faisant en sorte que les conditions de la phase continue soient telles que S₁ soit miscible dans S₂. On obtient ainsi une solution colloïdale stable de nanocapsules de diamètre de l'ordre de 300 nanomètres.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PREPARATION DE NANOCAPSULES DE TYPE VESICULAIRE

5

DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION :

Le domaine technique de l'invention est celui des nanoparticules destinées, en particulier, à l'encapsulation de principes actifs de nature
10 médicamenteuse, cosmétique, diététique, phytosanitaire ou autre. Il s'agit donc, en d'autres termes, de systèmes colloïdaux transporteurs notamment de principes actifs. De tels systèmes colloïdaux préservent ces principes actifs et peuvent permettre leur libération contrôlée et/ou prolongée au niveau de leur site d'action. Ces systèmes peuvent également avoir comme vocation de masquer le goût et/ou de diminuer la
15 toxicité de certains principes actifs.

Plus précisément, la présente invention concerne la préparation de nanocapsules susceptibles de comprendre au moins un principe actif, ces nanocapsules étant des vésicules dont l'enveloppe est constituée par au moins un matériau macromoléculaire.

20 La présente invention vise également les nanocapsules telles qu'obtenues par ce procédé, les suspensions colloïdales comprenant ces nanocapsules, ainsi que les compositions, par exemple thérapeutiques, comprenant lesdites nanocapsules en suspension colloïdale ou non.

25 ETAT DE LA TECHNIQUE :

On distingue trois familles de vecteurs submicroscopiques permettant le transport de principes actifs, à savoir :

les liposomes, les nanosphères et les nanocapsules.

30 Les liposomes sont des vésicules submicroniques dont la paroi est constituée d'un ou plusieurs feuillets, comprenant chacun une bicouche à base de phospholipides. Les liposomes présentent notamment les inconvénients suivants :

- a) Instabilité physique
- b) Instabilité chimique des phospholipides constitutifs (par ex.
35 hydrolyses ou formation de peroxydes)
- c) Mauvaise reproductibilité de lot à lot

d) Perte du principe actif

Les nanosphères correspondent à des structures de type matriciel formées par des sphères solides, dans lesquelles le principe actif est piégé et/ou dissous.

Les nanocapsules sont des vésicules comportant une enveloppe
5 généralement de nature macromoléculaire. Le ou les principe(s) actif(s) sont susceptibles d'être contenus dans le noyau délimité par ladite enveloppe et/ou adsorbés sur l'enveloppe des vésicules.

La littérature scientifique relative à la caractérisation et à la préparation de ces vecteurs nanoparticulaires colloïdaux de transport de principes actifs, est riche.

10 A titre d'illustration de la famille des nanosphères, on peut évoquer le brevet américain N° 5 118 528, qui décrit des nanoparticules matricielles à base de polymères et obtenues selon une technique, dans laquelle :

➤ d'une part, on dissout un matériau filmogène constitué par un polymère d'acide lactique dans de l'acétone (phase I)

15 ➤ et, d'autre part, on prépare un plus grand volume d'une deuxième phase liquide (phase II) consistant essentiellement en un non-solvant du matériau filmogène, ce non-solvant étant, par exemple, de l'eau.

Les tensioactifs peuvent être ajoutés à la phase I contenant le polymère et/ou à la phase II aqueuse. Ils sont par exemple constitués par un polypropylène-glycol et par un tensioactif non ionique ajouté dans la phase II aqueuse. Selon ce
20 procédé, les phases I et II sont mises en présence sous agitation magnétique à 100 tours/min. Le mélange formé est opalescent, ce qui témoigne de la formation de nanoparticules ou vésicules sphériques de polymères d'acide lactique de diamètre environ égal à 200 nanomètres. L'acétone est éliminé de cette suspension colloïdale
25 de nanoparticules par tirage sous vide. On peut également éliminer l'eau par ultrafiltration et séchage, pour produire une poudre de nanosphères. En complément ou en remplacement de l'eau dans la phase II, on peut utiliser un alcool tel que l'éthanol. Ces nanosphères matricielles ne donnent pas entièrement satisfaction, notamment au regard des points suivants :

- 30 a) faible rendement
b) nécessité de grands volumes de solvant
c) difficulté pour contrôler la taille de particules.

Il est également possible de préparer des nanosphères matricielles, en mettant en oeuvre une technique d'extraction du solvant du polymère constitutif
35 desdites nanosphères. Cette technique est fondée sur la restauration de la miscibilité du solvant du polymère, dans le solvant formant la phase continue homogène de la

suspension colloïdale. Il s'agit de la technique de relargage « salting out ». Elle est décrite notamment dans le brevet US N° 4 968 350. Le procédé décrit dans ce brevet consiste à préparer une première solution I aqueuse concentrée d'un solide du type électrolyte (par exemple MgCl_2) à laquelle est ajoutée une quantité suffisante d'un colloïde protecteur (par exemple alcool polyvinylique), de façon à produire une solution visqueuse ou un gel. On réalise par ailleurs une seconde solution II à base d'un polymère non hydrosoluble et formant le matériau constitutif des nanosphères. Ce polymère est par exemple l'acétate de cellulose ou l'acétophtalate de cellulose. Le solvant mis en oeuvre est l'acétone. On mélange ensuite les deux solutions I et II l'une à l'autre sous agitation, de manière à obtenir une émulsion de la solution II de polymère dans le gel aqueux d'alcool polyvinylique + MgCl_2 . Les nanosphères sont obtenues grâce à l'extraction de l'acétone de la phase I hétérogène polymère vers la phase II continue aqueuse. Ce transfert est obtenu par addition d'eau dans l'émulsion, ce qui provoque la restauration de conditions physicochimiques permettant que l'acétone et l'eau soient miscibles. La concentration en MgCl_2 est réduite en deçà d'une concentration limite. Selon une variante, on ne prévoit pas d'agent du type MgCl_2 insolubilisant l'acétone dans la solution II de polymère. Dans ce cas, cette dernière est directement émulsifiée dans l'hydrocolloïde. Les sels et solvants organiques peuvent être éliminés par filtration à flux tangentiel afin de récupérer les nanocapsules sous forme d'une dispersion colloïdale aqueuse ou sous forme de poudre par centrifugation/séchage de la dispersion.

Les nanosphères obtenues par « salting out » souffrent naturellement des inconvénients attachés à ce type de nanoparticules vecteurs de principes actifs. Il s'agit entre autres :

- a) usage de grandes quantités d'acétone et de sels
- b) longues étapes de purification
- c) incompatibilité possible entre le sel et certains composés bioactifs
- d) grandes quantités d'alcool polyvinylique résiduel, ce qui n'est pas acceptable pour une administration intraveineuse.

Les nanocapsules ont ceci d'avantageux sur les nanosphères et les liposomes, qu'elles permettent une meilleure protection des principes actifs incorporés ou encapsulés, de même qu'un meilleur contrôle de leur libération in vivo. En outre, elles permettent l'incorporation de grandes quantités de principes actifs huileux.

Parmi les techniques traditionnelles de préparation de nanocapsules, la polymérisation interfaciale figure en bonne place. Cette technique est une polymérisation de monomères à l'interface d'une émulsion eau dans huile ou huile

dans eau. Le polymère se développe en formant une paroi autour des globules de phase hétérogène, ce qui conduit finalement à une enveloppe encapsulant ladite phase hétérogène contenant ou non le principe actif. On produit ainsi une multitude de vésicules en suspension dans la phase continue.

- 5 Classiquement les polymères d'enveloppe des nanocapsules sont des polymères acryliques, méthacryliques ou alkyles cyano(meth)acryliques. Le brevet US N° 4 329 332 divulgue la préparation de nanocapsules par introduction du monomère alkylcyanoacrylate, dans une solution aqueuse d'un agent tensioactif de préférence non ionique, tel que le monolaurate de polyhydroxyéthyl-sorbitan. Le milieu est ensuite soumis à une agitation vigoureuse, de manière à former une solution micellaire. Le pH de cette solution est ajusté à 2-3, à l'aide d'un acide physiologiquement acceptable. L'adjonction de l'éventuel principe actif se fait par dissolution dans la phase aqueuse réactionnelle. Les nanocapsules obtenues ont une taille d'environ 200 nanomètres. En outre, il est à noter que le pH acide de la phase aqueuse peut être dommageable à un certain nombre de principes actifs. Les nanocapsules selon ce brevet ont également pour inconvénient de faire intervenir des monomères, qui sont potentiellement toxiques à l'état de résidus. Ces nanocapsules ont également ceci de désavantageux, qu'une réaction chimique est possible entre le polymère et certains principes actifs.

- 20 La demande de brevet PCT WO 94/15 590 décrit des nanocapsules dont le polymère d'enveloppe est constitué par un alkyl-2-cyanopolyacrylate (alkyl = 4-ter-octyl-phényl-, 2'-carboxyéthyl-, hexadécyl-,). Selon ce procédé, on utilise des monomères alkylcyanoacrylates hydrophiles (ester d'acide cyanoacrylique avec du polyéthylène glycol) ou lipophiles (hexadécyl-2-cyanoacrylate) et on met en oeuvre des systèmes mono ou biphasiques. Dans les systèmes monophasiques, le principe actif constitue lui-même la phase dispersée servant de support à la polymérisation qui conduit aux nanocapsules. Dans les systèmes biphasiques faisant intervenir deux liquides non miscibles l'un à l'autre, le principe actif est contenu dans l'une des phases, l'ensemble formant la phase dispersée de l'émulsion, siège de la polymérisation interfaciale.

- 30 La demande PCT WO 94 17789 divulgue plus précisément des nanocapsules obtenues par polymérisation interfaciale, dans un système biphasique.

- Le brevet US N° 5 500 224 divulgue une composition pharmaceutique comprenant des suspensions colloïdales de nanocapsules préparées par polymérisation interfaciale de n-butyle-2-cyanoacrylate sur des micelles comportant du tampon acide acétique pH 4,3 et un tensioactif du type laurylsulfate de sodium. La phase huileuse

continue est constituée par du mygliol (triglycéride d'acide gras en C₈-C₁₀) additionné de monooléate de sorbitane (SPAN 80).

Les nanocapsules obtenues ont un diamètre de l'ordre de 250 nanomètres. Le principe actif est contenu dans la phase aqueuse dispersée formant le coeur des nanocapsules.

5 La polymérisation interfaciale permet également de préparer des nanosphères.

Les nanoparticules obtenues par polymérisation interfaciale présentent un certain nombre d'inconvénients, dont certains sont évoqués ci-après.

10 Dans certains cas, cette technique fait intervenir des solvants organiques qui sont pharmaceutiquement rédhibitoires en raison de leur haute toxicité. Il est alors indispensable de purifier les nanocapsules en éliminant ces solvants indésirables. Cela complique beaucoup le procédé et grève lourdement son coût de revient.

En outre, cette technique peut nécessiter l'emploi de macromolécules du type sérum albumine ou dextrane, qui présentent le grave défaut d'être immunogène.

15 De plus, les alkylcyanoacrylates sont des polymères d'enveloppe dont la biocomptabilité laisse encore à désirer. De surcroît, la toxicité des monomères utilisés pour préparer ces polymères, est certaine, ainsi que celle des produits obtenus après biodégradation.

20 Par ailleurs, la technique de polymérisation interfaciale est relativement contraignante donc coûteuse notamment au regard des conditions de polymérisation.

Pour être complet, on signalera également l'existence du brevet FR 2 084 199, qui concerne l'obtention non pas de nano mais de microcapsules, par la technique de « salting out ». Il s'agit donc, selon ce brevet, de préparation de microgranulés sphériques s'écoulant librement, solides, et comprenant une matrice polymère enrobant des particules liquides ou solides de substances encapsulées. Ce
25 procédé comprend les étapes suivantes :

a - préparation d'une solution du polymère d'encapsulage (éthylcellulose) dans un solvant (n-butanol) soluble à 15 % en poids **au plus** dans l'eau à 20° C ;

30 b - dissolution ou dispersion dans la solution a, d'un matériau à enrober solide ou liquide, par exemple de l'huile de paraffine ;

c - dispersion de la solution ou de l'émulsion obtenue (phase organique A) dans un liquide aqueux (phase aqueuse B = eau saturée en n-butanol) non miscible avec le solvant organique ;

35 d - migration lente et sous contrôle du solvant organique (n-butanol) de la phase organique A dans la phase aqueuse B, de façon que le polymère dissous soit

déposé à la surface des particules dispersées dans B, cette migration s'opérant par incorporation d'eau dans le milieu ;

e - séparation et éventuellement séchage des particules solidifiées, c'est-à-dire le mélange de granulés.

- 5 Les vésicules obtenues sont des microcapsules de diamètre compris entre 80 et 500 μ . Ce sont des vésicules constituées par un noyau à base d'huile de paraffine enveloppée d'éthyle cellulose. Il est clair que le solvant n-butanol est mis en oeuvre dans ce procédé sous forme pure et non sous forme d'une solution d'eau dans le n-butanol. Par ailleurs, ce procédé est contraignant en ce qu'il impose de choisir un solvant dont
- 10 la solubilité dans l'eau n'excède pas 15 % en poids à 20 °C.

BREF EXPOSE DE L'INVENTION :

15 Dans cet état de la technique, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir un procédé de préparation de nanocapsules chargées ou non en principes actifs et formées par des vésicules dont l'enveloppe est constituée par au moins un polymère, lesdites nanocapsules se devant :

- d'être dispersibles en phase liquide, par exemple aqueuse, sous forme colloïdale,
- 20 - d'être exemptes de produits toxiques,
- d'être constituées par des substances biocompatibles et éventuellement biodégradables,
- d'être stables en suspension colloïdale,
- de permettre une bonne protection du principe actif éventuellement encapsulé, de même qu'une libération prolongée et/ou contrôlée de
- 25 celui-ci in vivo,
- et d'être obtainable de manière simple et économique.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un procédé de préparation de nanocapsules du type de celui sus-visé et qui soit en outre

30 aisé et rentable à mettre en oeuvre à l'échelle industrielle.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un procédé de préparation de nanocapsules du type visé supra permettant d'obtenir de manière fiable et reproductible des particules de taille inférieure à 1 μ m.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un

35 procédé de préparation de nanocapsules du type visé supra et ne nécessitant pas d'étapes de purification lourdes et coûteuses.

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir un procédé de préparation de nanocapsules de type visé supra et permettant l'encapsulation d'une grande variété de principes actifs de nature hydrophile ou lipophile.

5 Un autre objectif de l'invention est de fournir une composition colloïdale de nanocapsules obtenue selon le procédé sus-visé et répondant aux spécifications attendues, notamment dans le domaine pharmaceutique, pour des voies d'administration orale, parentérale dermique, ou pour des applications sur des muqueuses.

10 Un autre objectif de l'invention est de fournir une composition thérapeutique comprenant des nanocapsules ou la suspension colloïdale sus-visée.

S'étant fixée tous ces objectifs, la demanderesse a eu le mérite de mettre en évidence, de manière tout à fait surprenante et inattendue, qu'il est possible de préparer des nanocapsules

15 - en faisant intervenir deux phases non huileuses, non miscibles l'une à l'autre et une troisième phase huileuse ;

- en réalisant une émulsion huile dans eau, dont la phase dispersée huileuse contient le polymère d'enveloppe ;

20 - et en extrayant le solvant du polymère d'enveloppe contenu dans la phase dispersée lipophile en faisant en sorte que les conditions de la phase continue soient telles que le solvant du polymère d'enveloppe redevienne au moins en partie miscible dans la phase continue.

Grâce à ces dispositions, la demanderesse a pu observer avec étonnement, après de nombreux travaux et essais, que la solidification du polymère se produisait à l'interface de l'émulsion et se développait en formant les parois des nanocapsules renfermant la phase hétérogène.

Il s'ensuit que les objectifs fixés au départ, parmi d'autres, ont pu être atteints par la présente invention, qui concerne un procédé de préparation de nanocapsules (NC) susceptibles de comprendre au moins un principe actif (PA), ces nanocapsules étant des vésicules de taille moyenne inférieure à 1000 μm et dont l'enveloppe est constituée par au moins un polymère (PE),

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :

35 - 1 - à mettre en oeuvre au moins trois substances liquides (S_1 , S_2 , S_3), au moins un polymère d'enveloppe (PE), et éventuellement un ou plusieurs principes actifs (PA),

ces substances étant choisies de telle sorte que :

- * S_1 est un solvant/dispersant organique, au moins partiellement miscible avec S_2 et S_3 ,
et agissant comme solvant et/ou dispersant de PE et de l'éventuel PA,
 - * S_2 est un non-solvant de PE, non miscible à S_3 ,
 - * S_3 est un liquide, de préférence une phase huileuse, non-solvant de PE et solvant/dispersant de l'éventuel PA ; S_3 étant en outre destiné à rentrer dans la constitution du coeur des NC ;
 - 2 - à réaliser une première phase liquide homogène I comprenant une solution de PE, de S_3 et, éventuellement de PA dans S_1 ; S_1 étant apporté par l'intermédiaire d'une solution de S_2 dans S_1 , de préférence saturée en S_2 .
 - 3 - à préparer une deuxième phase liquide homogène II, comprenant le solvant S_2 et dans laquelle S_1 peut être émulsifiée,
 - 4 - à mettre en présence les phases I et II, en leur adjoignant éventuellement au moins un tensioactif stabilisant,
 - 5 - à procéder à la mise en émulsion du mélange obtenu à l'étape 4, pour produire une émulsion de I dans II,
 - 6 - à ajouter du solvant S_2 dans l'émulsion I/II, de façon à instaurer dans la phase homogène II, des conditions telles que S_1 soit au moins en partie miscible à S_2 et permettre ainsi la diffusion de S_1 de la phase I dans la phase II, pour obtenir in fine les NC en suspension dans une nouvelle phase continue III,
 - 7 - éventuellement à éliminer tout ou partie de S_1 et/ou S_2 ,
- Le procédé selon l'invention s'articule autour du choix du solvant/dispersant S_1 et du non solvant S_2 , ainsi que sur la miscibilité partielle de S_1 et de S_2 .
- Un autre fondement de l'invention tient à la réalisation d'une émulsion
- dont la phase dispersée contient le polymère d'enveloppe, le solvant/dispersant S_1 , l'éventuel PA et l'huile S_3
 - et dont la phase continue contient principalement S_2 , les conditions étant telles que S_1 n'est plus soluble dans S_2 .
- Le procédé de l'invention est également basé sur la disposition selon laquelle on met fin à la non miscibilité de S_1 dans S_2 après la réalisation de l'émulsion, de façon à tirer S_1 de la phase dispersée vers la phase continue et permettre ainsi la

solidification du polymère d'enveloppe et subséquemment la formation des nanocapsules. Il ne reste plus alors qu'à éliminer S_1 et tout ou partie de S_2 .

Enfin, la caractéristique préférée de saturation mutuelle des solvants S_1 , S_2 dans l'étape ②, favorise, contre toute attente, l'obtention des nanoparticules de
5 taille moyenne inférieure au micron.

EXPOSE DETAILLE DE L'INVENTION

Un tel procédé est commode à mettre en oeuvre. Il conduit à des
10 nanocapsules de taille moyenne inférieure à 1000 nanomètres, de préférence à 500 nanomètres. La stabilité en suspension colloïdale de ces nanocapsules est avérée. Elle confère au principe actif qu'elles sont susceptibles d'encapsuler soit dans leur coeur, soit par adsorption sur leur paroi, une protection au stockage ainsi que lors de leur transport vers leur site d'action. Ces nanoparticules sont en effet tout à fait
15 appropriées pour être utilisées comme système colloïdal de vectorisation de principes actifs, notamment pharmaceutiques. Ces nanocapsules ne sont pas toxiques aussi bien au stade du produit fini qu'au stade méthodologique au travers des matériaux et dispositifs mis en oeuvre pour leur obtention.

Le fait d'utiliser une huile, une émulsion du type huile dans eau et une solidification de
20 la coque polymère par une extraction de solvant reposant sur l'instauration de conditions de solubilisation ou de miscibilité dans la phase continue non huileuse, sont des éléments tout à fait novateurs qui traduisent le mérite et le caractère inventif du procédé ici considéré.

L'activité inventive est encore renforcée par le fait qu'il n'était absolument pas
25 prédictible que le polymère se solidifie à l'interface selon une structure pariétale. La solidification aurait pu, par exemple, intervenir dans la masse de la phase hétérogène, de préférence huileuse.

Les notions de solubilité et de miscibilité auxquelles on se réfère, à titre d'exemple non limitatif, dans le cadre de la présente sont explicitées notamment au
30 chapitre 14 page 340 et suivantes de l'ouvrage PHARMACOPEE GMP.

On reviendra plus en détail ci-après sur l'étape ① du procédé selon l'invention consistant dans le choix des matières premières S_1 , S_2 , S_3 , PE et éventuellement PA.

Dans l'étape ②, on prépare une première phase liquide homogène I en
35 dissolvant le polymère d'enveloppe PE et le liquide S_3 , de préférence huileux, et éventuellement le principe actif PA dans le solvant S_1 .

Conformément à l'invention, ce dernier peut être employé pur ou être constitué par une solution du non-solvant S_2 dans S_1 .

Dans un tel cas de figure, il est préférable (sans que cela ne soit limitatif) que cette solution de S_2 dans S_1 , soit saturée en S_2 . Cela rend plus commode l'étape ③ d'émulsification de la phase I dans la phase II, puisque cela supprime le temps de latence induit par l'amenée à saturation de S_2 dans S_1 . La saturation mutuelle des solvants favorise le processus d'émulsification.

En pratique, cette étape ②, est réalisée de manière conventionnelle, dans des conteneurs, de préférence équipés de moyens d'agitation. Cette étape s'effectue avantageusement à température ambiante et à pression atmosphérique.

L'étape ③ du procédé selon l'invention est celle au cours de laquelle, on prépare la deuxième phase liquide homogène II. Cette phase II est caractérisée en ce qu'elle comprend le solvant S_2 et en ce que elle constitue un milieu dans lequel S_1 et plus généralement la phase I peut être émulsifiée.

Selon une variante 3' de cette étape ③, on prépare une phase II comprenant exclusivement S_2 ou constituée par une solution de S_1 dans S_2 , S_1 n'étant pas à saturation. Dans un tel cas de figure, on fait en sorte que dans l'étape ⑤, les quantités de phase I et II (Volumes totaux en S_1 et S_2) mises en oeuvre soient en proportions telles que se forme l'émulsion de I dans II. Dans cette variante 3', il faut donc tout d'abord que la phase I mélangée à la phase II, amène S_1 à saturation dans S_2 , avant que l'émulsion I/II se produise. Cela allonge d'autant l'étape ③ comme dans le cas évoqué ci-dessus, où la phase I n'est pas formée par une solution non-saturée de S_2 dans S_1 .

Dans une variante 3'' de l'étape ③, on prépare une phase II à base de S_2 et comprenant :

- a - soit S_1 à saturation
- b - soit au moins un agent A apte à rendre S_1 non miscible à S_2
- c - soit la combinaison de a et de b.

Dans cette variante, les sous-variantes a, b, c ont pour vocation d'améliorer la formation de l'émulsion et, dans le meilleur des cas, de permettre à celle-ci de se produire instantanément après le mélange des phases I et II.

En tout état de cause conformément à l'invention, on privilégie le mode opératoire selon lequel, lors du mélange des phases I et II, le solvant S_1 et le non-solvant S_2 ne sont que partiellement miscibles l'un à l'autre.

En pratique, on utilise, de préférence, dans la phase I une solution de S_1 saturée en S_2 et dans la phase II une solution de S_2 saturée en S_1 .

L'étape ③ se déroule idéalement avec les mêmes moyens matériels et dans les mêmes conditions de température et de pression que l'étape ②. Il en va d'ailleurs de même en ce qui concerne les étapes ④ et ⑤ de mise en présence et d'émulsification des phases I et II.

- 5 Selon une disposition avantageuse de l'invention, la mise en émulsion ⑤ est réalisée sous agitation vigoureuse, de préférence à l'aide de moyens mécaniques fonctionnant à un régime ≥ 1500 tr/min, de préférence $\geq 5\,000$ tr/min et, plus préférentiellement encore compris entre 7 000 et 10 000 tr/min.
- A titre d'exemple de dispositif d'émulsification convenable pour le procédé selon
- 10 l'invention, on peut citer un agitateur mécanique à hélice ou un homogénéisateur (ultra-Turrax®)

La formation des nanocapsules NC par solidification du polymère PE à l'interface de l'émulsion I dans II, se produit lors de l'étape ⑥. Il s'agit dans cette étape, de faire en sorte que S_1 devienne miscible à S_2 .

- 15 De manière préférée, on parvient à cela en complétant l'émulsion I/II à l'aide du solvant S_2 .

Selon une variante envisageable dans le cas où l'on met en oeuvre dans la phase II, un agent A apte à rendre S_1 non miscible à S_2 , il est possible de prévoir la formation de NC par dilution de la phase externe au moyen d'eau et d'éliminer A par un moyen

20 approprié (par ex. filtration à flux tangentiel).

Une fois réalisé le transfert de S_1 dans la phase homogène II, on procède dans l'étape ⑦, à l'élimination de tout ou partie de S_1 et/ou S_2 . Avantageusement on élimine S_1 par tout moyen approprié tel que le soutirage par le vide plus ou moins poussé, l'évaporation, la distillation ou tout autre moyen de fractionnement.

- 25 Après élimination de S_1 de la phase II, on obtient une suspension colloïdale de nanocapsules NC dans S_2 . Cette suspension peut être plus ou moins concentrée par élimination et/ou ajout de S_2 .

Les moyens mis en oeuvre pour éliminer S_2 peuvent être les mêmes que ceux employés pour retirer S_1 . En pratique, on peut par exemple purifier la suspension par

30 filtration à flux tangentiel, de manière à recueillir les nanocapsules NC que l'on peut ensuite sécher, de manière à les produire sous forme sèche et solide. Il est également tout-à-fait envisageable de procéder à une atomisation ou à une lyophilisation (en présence ou non d'un agent cryoprotecteur) des nanocapsules NC en suspension.

- Ces nanocapsules NC sont parfaitement caractérisées et possèdent une
- 35 structure stable et bien définie. Une fois formées, elles confèrent à la suspension un aspect blanc laiteux à reflets bleutés tout à fait révélateur et spécifique.

Ces nanocapsules possèdent également des densités et des vitesses de sédimentation spécifiques, qui permettent de les distinguer des autres nanoparticules, telles que les nanosphères comprises dans les nanoémulsions.

La stabilité de la suspension colloïdale selon l'invention est d'au moins
5 une année.

Avantageusement, la température de mise en oeuvre du procédé est comprise entre 4 et 45° C de préférence entre 15 et 25° C.

Selon une disposition préférée de l'invention, on choisit les proportions en S_1 , S_2 , S_3 et PE, de telle sorte que la taille des NC soit inférieure à 1000nm, ces
10 proportions étant, de préférence, les suivantes (exprimées en % par rapport à S_1) :

- * PE compris entre 0,1 et 100, de préférence entre 0,5 et 20 poids sec/volume,

- * S_2 compris entre 51 et 1000, de préférence entre 100 et 500 V/V,

- * S_3 compris entre 0,1 et 10, de préférence entre 0,1 et 5,0 V/V.

15 En tout état de cause, on fait en sorte que, sur le plan quantitatif, la proportion de S_2 soit la plus faible possible de manière à disposer d'une suspension concentrée de nanocapsules. Il en va de même en ce qui concerne les quantités de S_1 mises en oeuvre, de manière à faciliter l'élimination de ce dernier.

Les nanocapsules NC produites par le procédé selon l'invention ont
20 avantageusement une taille contrôlée inférieure à 1000 nanomètres, de préférence à 500 nanomètres, et plus préférentiellement comprise entre 50 et 350 nanomètres.

S'agissant des produits mis en oeuvre dans le procédé conforme à l'invention, on précise ci-après, sans que cela ne soit limitatif, les groupes de substances S_1 , S_2 , PE et PA, vers lesquels le choix se porte de préférence.

25 Le solvant S_1 est avantageusement sélectionné dans la famille des alcools, phénols, cétones, esters d'acides carboxyliques et leurs mélanges.

Plus précisément, on retient particulièrement le groupe de produits suivants pour S_1 :
acétate d'éthyle, alcool benzylique, propylène carbonate, butanol, butanone et leurs mélanges,

30 Le non-solvant S_2 est avantageusement un liquide ou un mélange de liquides contenant de l'eau et/ou au moins un alcool. Ainsi S_2 est sélectionné plus spécialement dans le groupe de produits suivants :

eau, alcool - par exemple éthanol, propylène-glycol ou glycérine - et leurs mélanges.

Le liquide S_3 , de préférence, huileux est choisi dans la famille des huiles végétales ou minérales, huiles neutres, huiles essentielles, acides gras, esters d'acides carboxyliques, terpènes, vitamines et leurs mélanges.

Avantageusement, on retiendra les produits huileux suivants :

- 5 Mygliol®, 810, 812 et 840 (Dynamit Nobel, Germany), Labrafac® lipophile, Lauroglycol (Gattefossé, France), huile minérale, huile d'olive, huile de sésame, huile de maïs, huile de coton, huile de cacahuète, benzoate de benzyle, myristate d'isopropyle, huile essentielle de lavande, huile essentielle de bouquet, vitamine E, clofibrate, etc.

- 10 En ce qui concerne les polymères d'enveloppe **PE**, la sélection s'opère parmi les homo et/ou copolymères naturels et synthétiques biocompatibles. Il peut s'agir par exemple de l'acide polylactique D ou L et DL, copolymères d'acide lactique et d'acide glycolique ; la poly ϵ -caprolactone ; la polypropiolactone ; la
- 15 polybutyrolactone ; la polypivalactone ; l'acétate butyrate de cellulose ; l'éthylcellulose ; la phtalate d'hydroxyméthylpropylcellulose ; la gomme laque ; l'acéto-phtale de polyvinyle ; l'acétophtalate de cellulose ; les acrylates et les polymères acryliques (Eudragit®, Röhm Pharma, Germany) ; les polymères obtenus à partir d'esters cycliques des acides hydroxybutyrique, hydroxyisobutyrique,
- 20 hydroxyméthylvalérique, phényl-lactique, hydroxyéthylbutyrique, le polybétamalat de benzyle, les polycyanocrylates d'alkyle, les polyéthylène-vinyl acétate ; et leurs mélanges.

Conformément à l'invention **PE** est choisi dans le groupe de polymères suivants :

- 25 • (co)polymère d'acide(s) α -hydrocarboxylique(s), de préférence l'acide lactique et/ou l'acide glycolique,
- (co)polymère d'acide (meth)acrylique et/ou de méthacrylate,
- poly- ϵ -caprolactone,
- cellulose et ses dérivés
- 30 • bloc polymère d'acide α -hydroxycarboxylique et du poly(oxyde d'éthylène)
- cyanocrylates,
- et copolymères et/ou mélanges d'entre eux.

Les principes actifs **PA** susceptibles d'être encapsulés dans les nanocapsules **NC** préparées conformément à l'invention, peuvent être divers et variés.

- 35 La condition à respecter quant au choix du principe actif tient à sa solubilité et/ou à son aptitude à la dispersion dans le solvant S_1 . De manière générale, il peut s'agir par

exemple de principes actifs utilisés en allergologie, anesthésiologie, cancerologie, cardiologie et angiologie, dermatologie, endocrinologie, gastroentérologie, gynécologie, hématologie, hépatologie, immunologie, infectiologie, neurologie, ophtalmologie, parasitologie, pneumologie, rhumatologie, stomatologie, toxicologie, ou utilisés en tant qu'antalgiques ou anti-inflammatoires...

De préférence, le principe actif est choisi dans le groupe de produits suivants :

indométacine, hormones, - de préférence progestérone-Estradiol-, Chlorambucil, S₃, vitamines (de préférence vit E et K), cyclosporine A, ibuprofène, propranolol, acide valproïque, clofibrate, etc, et leurs mélanges.

Concernant les tensioactifs stabilisants convenables pour l'étape ④ du procédé selon l'invention, on les choisit de préférence conformément à l'invention parmi les tensioactifs ioniques ou non ioniques. Plus précisément, le choix peut se porter par exemple sur les alcools polyvinyliques par exemple Mowiol® 4-88 (Hoechst, Frankfurt, Germany) ; les poloxamers par exemple Pluronic® F-68 et F-127 (BASF, Wyandotte, EU) ; les sels biliaires par exemple glycolate de sodium et les sels d'acides carboxyliques par exemple oléate de sodium.

Les avantages du procédé selon l'invention, sont nombreux. On peut citer entre autres :

- fiabilité,
- haut rendement,
- reproductibilité,
- transposition d'échelle facile pour des applications industrielles.
- mise en oeuvre d'équipements conventionnels non sophistiqués (en particulier les homogénéisateurs à haute pression ou les dispositifs d'ultrasonication ne sont pas indispensables)
- utilisation de solvants, de stabilisants et d'additifs non toxiques et bien tolérés par l'organisme.
- contrôle de la taille des nanocapsules NC obtenues.

Selon un autre de ces aspects, la présente invention vise également les nanocapsules NC *per se* telles qu'elles sont obtenues par le procédé ci-dessus défini ou par tout autre procédé conduisant au même résultat ou à un résultat semblable. En particulier, l'invention a pour objet des nanocapsules NC de taille inférieure à 1000 nanomètres, de préférence à 500 nanomètres, dont la paroi est constituée par au moins un polymère PE tel que présenté supra et qui comprenne, à l'état de trace ou

non, des substances S_1 et/ou S_2 et/ou S_3 et éventuellement un principe actif **PA** ; ces substances étant telles que définies supra.

La présente invention vise également une suspension colloïdale de nanocapsules **NC** caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir du produit issu de l'étape ⑥ du procédé tel que défini ci-dessus et/ou en redispersant les nanocapsules **NC** obtenus à l'issue de l'étape ⑦ dudit procédé, dans un non-solvant de **PE**.

Un autre objet de l'invention est constitué par une composition thérapeutique comprenant les **NC** chargés en **PA** et obtenus par le procédé tel que présenté ci-dessus ou par un procédé conduisant au même produit.

La présente invention sera mieux comprise à la lumière des exemples donnés ci-après. Ces derniers feront également ressortir tous les avantages et les variantes de mise en oeuvre du procédé selon l'invention. En outre, ces exemples comprendront la caractérisation et l'évaluation des propriétés des nanocapsules **NC** conformes à la présente invention.

Pour compléter l'illustration donnée par les exemples, on fournit en annexe, une **Figure 1** unique représentant une photographie au microscope électronique à balayage des nanocapsules selon l'invention - grossissement : x 14.000.

EXEMPLES

20

EXEMPLE 1 : PREPARATION DE NANOCAPSULES DE POLYMERE BIODEGRADABLE CONTENANT UN LIQUIDE ORGANIQUE

D'une part, 200 mg de polymère **PE** d'acide lactique D,L (MEDISORB® 100 DL) et 0,5 ml de triglycérides d'acides caprilyque/caprique - huile S_3 - (Mygliol® 812) sont dissous dans 20 ml d'acétate d'éthyle S_1 saturé avec de l'eau = S_2 (Phase I).

D'autre part, 2 g d'alcool polyvinylique (Mowiol® 4-88), agent tensioactif, sont dissous dans 40 ml d'eau (S_2) purifiée saturée avec de l'acétate d'éthyle S_1 (Phase II). La phase I à base de S_1 saturé avec S_2 (acétate d'éthyle + eau), est émulsionnée dans la phase aqueuse II (S_2) sous agitation vigoureuse (environ 8000tr/min) pendant dix minutes. 200 ml d'eau = S_2 sont ajoutés à l'émulsion sous agitation à fin de permettre la diffusion de l'acétate d'éthyle vers la phase II aqueuse. Le mélange (phase III) devient blanc laiteux avec des reflets bleutés dûs à la formation des nanocapsules **NC** dont la paroi est constitué de **PE**.

L'acétate d'éthyle S_1 est éliminé sous pression réduite (vide de la trompe à eau) et la suspension est concentrée, par élimination de l'eau S_2 dans les mêmes conditions, jusqu'au volume désiré.

La taille des nanocapsules NC mesurée dans un diffractomètre à rayon laser (Nanosizer® de la firme Coultronics) est de 329 nm avec un indice de dispersion de 2. L'existence des nanocapsules NC a été confirmée, d'une part, par cryofracture des nanocapsules et observation par microscopie électronique à balayage (Fig. 1) et, d'autre part, par la comparaison de la vitesse de sédimentation sous ultracentrifugation des nanocapsules selon l'invention et de nanoémulsions ou de nanosphères témoins préparées par la même méthode à la différence près que pour les nanoémulsions, il n'y a pas de polymère PE dans la préparation et pour les nanosphères, il n'y a pas d'huile S₃ dans la préparation. En effet, la vitesse de sédimentation de nanoémulsions, nanosphères et nanocapsules diffère en raison des constitutions différentes et par conséquent de leur densité. On peut mesurer la densité de ces systèmes par centrifugation isopycnique (sur un gradient de densité de silice colloïdale (Percoll®, Pharmacia, LKB, Suède). La centrifugation a été faite à 4° C et 1500 g pendant 3 heures. Des tubes marqueurs de densités connues (Sephadex®, Pharmacia) ont été utilisés pour calculer la densité des systèmes. Après centrifugation, elle est mesurée par la distance (h) entre le ménisque de la dispersion et la bande contenant les nanoparticules.

Résultats :

Nanoémulsions : Il n'y a pas sédimentation (h = 0)

Considérant que la densité du Mygliol® 812 est de 0,9438 g/cm³ (calculée avec un pycnomètre) il est logique que l'huile contenue dans la nanoémulsion tende à flotter.

Nanosphères : Sédimentation (h = 55,12 mm).

Densité calculée = 1,1405 g/cm³

La forte sédimentation démontre la constitution matricielle solide des particules.

Nanocapsules : Sédimentation (h = 14,98 mm)

Densité calculée = 1,0357 g/cm³

Cette sédimentation indique un état intermédiaire entre une nanoémulsion et des nanosphères.

Ceci indique que le polymère et l'huile font partie des particules.

Le fait qu'il y ait seulement une bande confirme la structure vésiculaire dans laquelle l'huile forme le noyau.

EXEMPLE 2 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT DES HUILES COSMETIQUES

On procède comme indiqué dans l'exemple 1 mais en substituant le Mygliol® 812 par une huile minérale dans la phase I d'acétate d'éthyle/eau.

Les nanocapsules NC ont une taille de 303 nm avec un indice de dispersion de 2.

EXEMPLE 3 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT UNE ESSENCE

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en substituant le Mygliol® 812 par 0,1 ml d'huile essentielle de lavande au niveau de la phase I d'acétate d'éthyle.

- 5 Les nanocapsules NC ont une taille de 304 nm avec un indice de dispersion de 2.

EXEMPLE 4 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT UN COLORANT LIPOPHILE

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en ajoutant 5 mg de Soudan III dans la phase I d'acétate d'éthyle.

- 10 Les nanocapsules ont une taille de 340 nm avec un indice de dispersion de 2.
La suspension des nanocapsules est ensuite centrifugée à 20 000 tr/min pendant 40 min. Le dépôt est séché sous vide en dessiccateur. Environ 30 mg du produit sec sont dissous dans 50 ml de chloroforme. L'absorbance de la solution est mesurée à 518 nm en référence à une courbe de calibration. Le pourcentage de Soudan III encapsulé
15 (rapporté au pourcentage du contenu initial) est de 100,8 %.

EXEMPLE 5 : PREPARATION DE NANOCAPSULES AVEC UN POLYMER DE SOLUBILITE DEPENDANT DU pH

- On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en substituant le polymère PE et le
20 solvant S₁ respectivement par de l'Eudragit® E (polymère acrylique soluble à pH gastrique) et par du propylène carbonate.
Les nanocapsules NC ont une taille de 239 nm avec un indice de dispersion de 3.

- 25 **EXEMPLE 6 : PREPARATION DE NANOCAPSULES AVEC UN POLYMER DE SOLUBILITE DEPENDANT DU pH, CONTENANT UN COLORANT LIPOPHILE**

- On procède comme indiqué dans l'exemple 4, mais en substituant le polymère PE et le solvant S₁ par de l'Eudragit® E et par de l'alcool benzylique, respectivement.
Les nanocapsules ont une taille de 287 nm avec un indice de dispersion de 2.
Le pourcentage de Soudan III encapsulé après filtration tangentielle (dispositif
30 Minitan®) est de 92,4 %.

EXEMPLE 7 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT UN PRINCIPE ACTIF SOLIDE

- On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en ajoutant 20 mg d'indométacine dans la phase I d'acétate d'éthyle. S₁ sature en eau S₂.
35 Les nanocapsules ont une taille de 314 nm avec un indice de dispersion de 2.

La suspension est centrifugée et séchée comme dans l'exemple 4. Environ 30 mg du produit sec sont dissous dans 20 ml de chloroforme. Après une dilution convenable avec du chloroforme, l'absorbance est, mesurée à 248 nm en référence à une courbe de calibration. Le pourcentage d'indométacine encapsulée est de 94,4 %.

5

EXEMPLE 8 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT UN PRINCIPE ACTIF LIQUIDE

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en remplaçant l'huile S₃ (mygliol) par du clofibrate S₃. Les nanocapsules ont une taille de 317 nm avec un indice de dispersion de 2.

10

La suspension est centrifugée et séchée comme dans l'exemple 4.

Environ 25 mg du matériel sec sont dissous dans 20 ml de chloroforme. L'absorbance est ensuite mesurée à 280 nm en référence à une courbe de calibration. Le pourcentage de clofibrate encapsulé est de 95,3 %.

15

EXEMPLE 9 : PREPARATION DE NANOCAPSULES CONTENANT UN ACTIF COSMETIQUE

On procède comme indiqué dans l'exemple 1, mais en substituant l'huile à de la vitamine E pour former S₃. Les nanoparticules ont une taille de 322 nm, avec un indice de dispersion de 2.

20

La suspension est centrifugée et séchée comme dans l'exemple 4.

Environ 20 mg du produit sec sont dissous dans 20 ml de chloroforme. L'absorbance est ensuite mesurée à 297 nm, en référence à une courbe de calibration. Le pourcentage de vitamine E encapsulée est de 92,2 %.

25

REVENDEICATIONS :

1 - Procédé de préparation de nanocapsules (NC) susceptibles de comprendre au moins un principe actif (PA), ces nanocapsules étant des vésicules de taille moyenne inférieure à 1000 nm et dont l'enveloppe est constituée par au moins un polymère (PE),

caractérisé en ce qu'il consiste essentiellement :

- 1 - à mettre en oeuvre au moins trois substances liquides (S_1 , S_2 , S_3), au moins un polymère d'enveloppe (PE), et éventuellement un ou plusieurs principes actifs (PA),

ces substances étant choisies de telle sorte que :

- * S_1 est un solvant/dispersant organique, au moins partiellement miscible avec S_2 et S_3 ,

et agissant comme solvant et/ou dispersant de PE et de l'éventuel PA,

- * S_2 est un non-solvant de PE, non miscible à S_3 ,

- * S_3 est un liquide, de préférence une phase huileuse, non-solvant de PE et solvant/dispersant de l'éventuel PA ; S_3 étant, en outre, destiné à rentrer dans la constitution du coeur des NC ;

- 2 - à réaliser une première phase liquide homogène I comprenant une solution de PE, de S_3 et, éventuellement de PA dans S_1 ; S_1 étant apporté par l'intermédiaire d'une solution de S_2 dans S_1 , de préférence saturée en S_2 .

- 3 - à préparer une deuxième phase liquide homogène II, comprenant le solvant S_2 et dans laquelle S_1 peut être émulsifiée,

- 4 - à mettre en présence les phases I et II, en leur adjoignant éventuellement au moins un tensioactif stabilisant,

- 5 - à procéder à la mise en émulsion du mélange obtenu à l'étape 4, pour produire une émulsion de I dans II,

- 6 - à ajouter du solvant S_2 dans l'émulsion I/II de façon à instaurer dans la phase homogène II, des conditions telles que S_1 soit au moins en partie miscible à S_2 et permettre ainsi la diffusion de S_1 de la phase I dans la phase II, pour obtenir in fine les NC en suspension dans une nouvelle phase continue III,

- 7 - éventuellement à éliminer tout ou partie de S_1 et/ou S_2 .

2 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'étape ③, on prépare une phase II comprenant exclusivement S_2 ou constituée par

une solution de S_1 dans S_2 , S_1 n'étant pas à saturation et en ce que, dans l'étape ⑤, on met en oeuvre des quantités de phases I et II (Volumes totaux en S_1 et S_2) dans des proportions choisies de telle sorte que se forme une émulsion de I dans II.

3 - Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'étape ③, on prépare une phase II à base de S_2 et comprenant :

- a - soit S_1 à saturation
- b - soit au moins un agent A apte à rendre S_1 non miscible à S_2
- c - soit la combinaison de a et de b.

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape ⑤ de mise en émulsion est réalisée par agitation mécanique à un régime ≥ 1500 tr/min.

5 - Procédé au moins selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'étape ⑦ (facultative) d'élimination de tout ou partie de S_1 et/ou de S_2 est réalisée par évaporation et/ou filtration tangentielle, et/ou (ultra)centrifugation et/ou atomisation, et/ou soutirage par le vide.

6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on choisit les proportions en S_1 , S_2 , S_3 et PE, de telle sorte que la taille des NC soit inférieure à 1000nm, ces proportions étant, de préférence, les suivantes (exprimées en % par rapport à S_1) :

- * PE compris entre 0,1 et 100, de préférence entre 0,5 et 20 poids sec/volume,
- * S_2 compris entre 51 et 1000, de préférence entre 100 et 500 V/V,
- * S_3 compris entre 0,1 et 10, de préférence entre 0,1 et 5,0 V/V.

7 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on sélectionne :

→ S_1 dans le groupe de produits suivants :

acétate d'éthyle, alcool benzylique, propylène carbonate, butanol, butanone et leurs mélanges,

→ S_2 dans le groupe de produits suivants :

eau, alcool - par exemple éthanol, propylène-glycol ou glycérine - et leurs mélanges,

→ S_3 dans le groupe de produits huileux suivants :

Mygliol® 810, 812 et 840 (Dynamit Nobel, Germany), Labrafac® lipophile, Lauroglycol (Gattefossé, France), huile minérale, huile d'olive, huile de sésame, huile de maïs, huile de coton, huile de cacahuète, benzoate de benzyle, myristate d'isopropyle, huile

essentielle de lavande, huile essentielle de bouquet, vitamine E, clofibrate.

→ **PE** dans le groupe de polymères suivants :

- 5 • (co)polymères d'acide(s) α -hydrocarboxylique(s), de préférence l'acide lactique et/ou l'acide glycolique,
- (co)polymère d'acide (meth)acrylique et/ou de méthacrylate,
- poly- ϵ -caprolactone,
- cellulose et ses dérivés
- 10 • bloc polymère d'acide α -hydroxycarboxylique et du poly(oxyde d'éthylène)
- cyanocrylates,
- et copolymères et/ou mélanges d'entre eux.

→ **PA** dans le groupe de produits suivants :

- 15 indométacine, hormones, - de préférence progestérone-Estradiol-, Chlorambucil, S_3 , vitamines (de préférence vit E et K, cyclosporine A, ibuprofen, propranolol, acide valproïque, clofibrate et leurs mélanges.

8 - Suspension colloïdale de **NC** caractérisée en ce qu'elle est obtenue à partir du produit de l'étape ⑥ du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et/ou en redispersant les **NC** obtenues à l'issue de l'étape ⑦ de ce procédé dans un non-solvant de **PE**.

9 - Composition thérapeutique caractérisée en ce qu'elle comprend des **NC** chargées en **PA** et obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

1/1

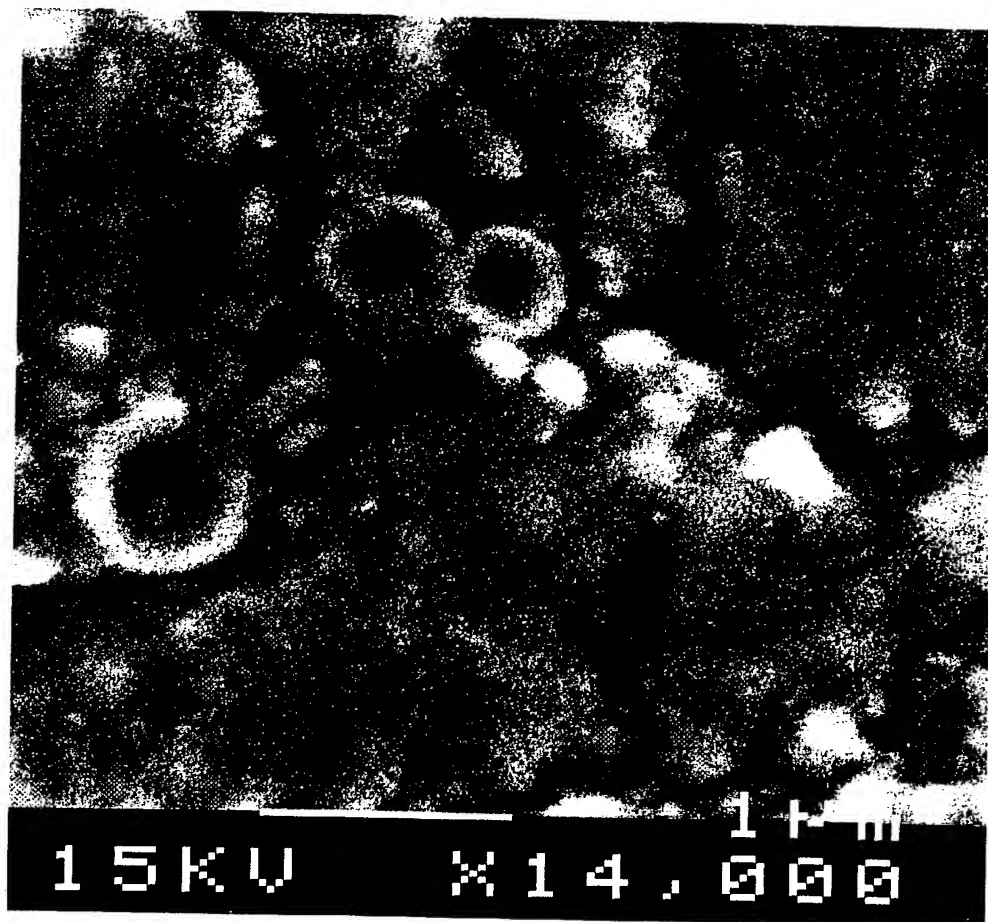


FIG 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/01611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 A61K9/51

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 084 199 A (FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 17 December 1971 cited in the application see page 2, line 6 - page 3, line 30 see page 4, line 1 - page 6, line 24 see claims 1,2,5-10 ---	1-9
A	EP 0 451 082 A (LABORATORIOS CUSI, S.A.) 9 October 1991 see page 3 - page 4; example 1 see claims 1-13 ---	1-9
A	WO 96 35414 A (CIBA-GEIGY AG ET AL.) 14 November 1996 see page 10; example 2 ---	1-9
A	DE 195 45 257 A (SCHERING AG) 19 June 1997 see the whole document -----	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1998

Date of mailing of the international search report

03/12/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/01611

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2084199 A	17-12-1971	DE 2010115 A	16-09-1971
		US 3737337 A	05-06-1973
EP 451082 A	09-10-1991	FR 2660193 A	04-10-1991
		AT 116846 T	15-01-1995
		DE 69106560 D	23-02-1995
		DE 69106560 T	11-05-1995
		DK 451082 T	19-06-1995
		ES 2071275 T	16-06-1995
		GR 3015693 T	31-07-1995
		JP 4221322 A	11-08-1992
		JP 7023325 B	15-03-1995
		US 5308624 A	03-05-1994
WO 9635414 A	14-11-1996	AU 5811996 A	29-11-1996
		CA 2219777 A	14-11-1996
		EP 0835103 A	15-04-1998
DE 19545257 A	19-06-1997	AU 7495596 A	19-06-1997
		WO 9719676 A	05-06-1997
		EP 0862418 A	09-09-1998
		NO 982364 A	25-05-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 98/01611

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 A61K9/51

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 084 199 A (FARBENFABRIKEN BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 17 décembre 1971 cité dans la demande voir page 2, ligne 6 - page 3, ligne 30 voir page 4, ligne 1 - page 6, ligne 24 voir revendications 1,2,5-10 ---	1-9
A	EP 0 451 082 A (LABORATORIOS CUSI, S.A.) 9 octobre 1991 voir page 3 - page 4; exemple 1 voir revendications 1-13 ---	1-9
A	WO 96 35414 A (CIBA-GEIGY AG ET AL.) 14 novembre 1996 voir page 10; exemple 2 ---	1-9
A	DE 195 45 257 A (SCHERING AG) 19 juin 1997 voir le document en entier -----	1-9



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 novembre 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/12/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De Je Internationale No

PCT/FR 98/01611

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2084199 A	17-12-1971	DE 2010115 A	16-09-1971
		US 3737337 A	05-06-1973
EP 451082 A	09-10-1991	FR 2660193 A	04-10-1991
		AT 116846 T	15-01-1995
		DE 69106560 D	23-02-1995
		DE 69106560 T	11-05-1995
		DK 451082 T	19-06-1995
		ES 2071275 T	16-06-1995
		GR 3015693 T	31-07-1995
		JP 4221322 A	11-08-1992
		JP 7023325 B	15-03-1995
		US 5308624 A	03-05-1994
WO 9635414 A	14-11-1996	AU 5811996 A	29-11-1996
		CA 2219777 A	14-11-1996
		EP 0835103 A	15-04-1998
DE 19545257 A	19-06-1997	AU 7495596 A	19-06-1997
		WO 9719676 A	05-06-1997
		EP 0862418 A	09-09-1998
		NO 982364 A	25-05-1998